

IB04 | 2446



MAILED	22 SEP 2004
WIPO	PCT

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

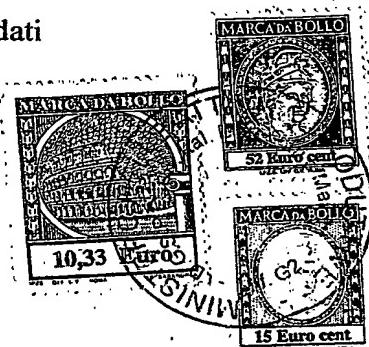
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
INVENZIONE INDUSTRIALE N. MI 2003 A 001594 del 01.08.2003

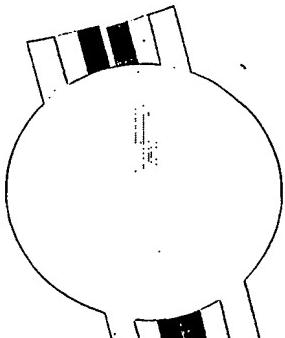
Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati risultano dall'accleso processo verbale di deposito.

Roma li..... 9 SET 2004



IL FUNZIONARIO

*Patto... bell...
dr. FEDIO GALLOPPO*



**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA MI2003A 001594

REG. A

DATA DI DEPOSITO

01/08/2003

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

11/11/1111

D. TITOLO

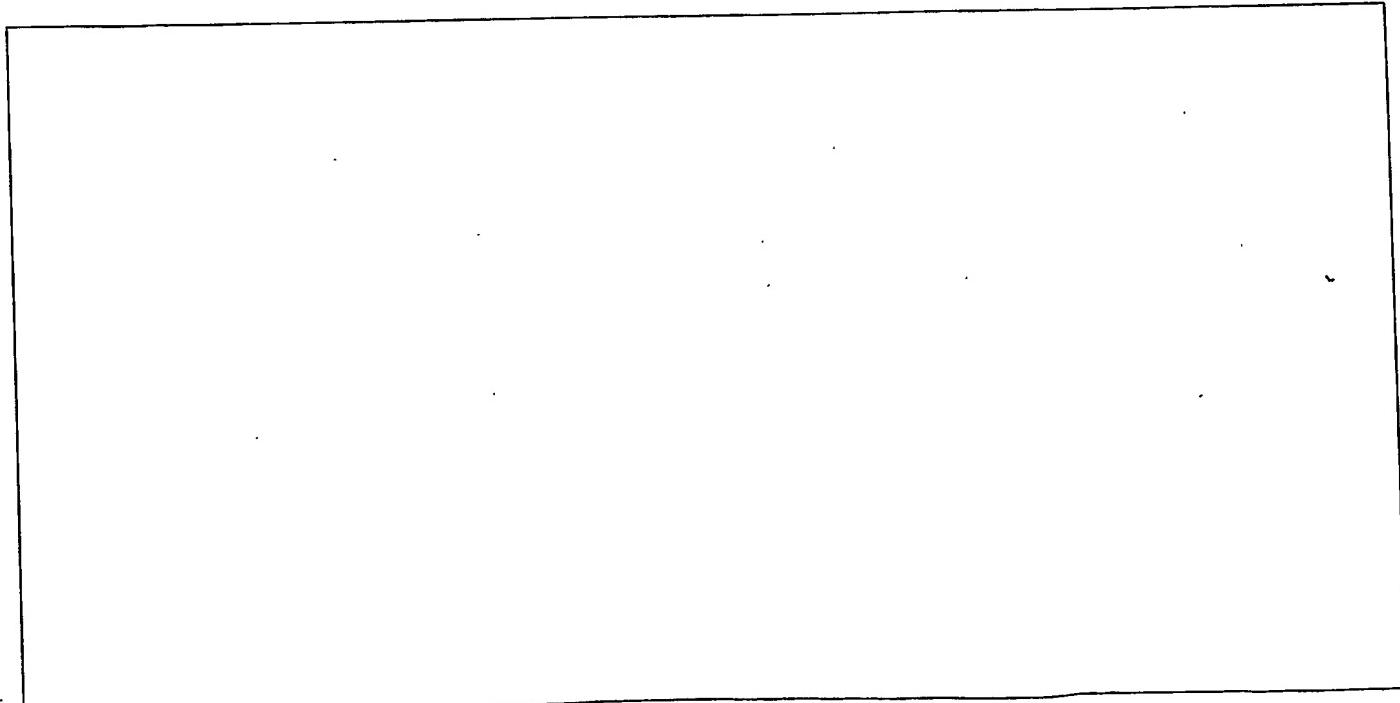
Procedimento per il prelievo e l'isolamento di ceppi batterici
adesi alla mucosa intestinale per via per endoscopica

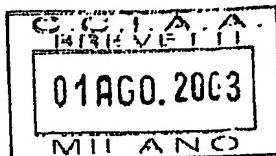
L. RIASSUNTO

La presente invenzione concerne un nuovo metodo per il prelievo e l'isolamento di ceppi batterici adesi alla mucosa intestinale per via per endoscopica mediante una tecnica innovativa detta "brushing".



M. DISEGNO





2003A001594

Descrizione dell'invenzione avente per titolo:

"Procedimento per il prelievo e l'isolamento di ceppi batterici adesi alla mucosa intestinale per via per endoscopica"

A nome ANIDRAL S.r.l., di nazionalità italiana, con sede a Novara

Inventori: MOGNA, Giovanni; DEL PIANO, Mario; STROZZI Gian Paolo;
MORELLI, Lorenzo

La presente invenzione concerne un nuovo metodo per il prelievo e l'isolamento di ceppi batterici adesi alla mucosa intestinale per via per endoscopica, in particolare un metodo di prelievo che impiega degli "spazzolini" per un utilizzo innovativo, qui denominata "brushing".

Il tratto gastrointestinale umano (GI) ospita diverse comunità di batteri, prevalentemente strettamente anaerobi, che oltre a svolgere importanti attività metaboliche, quali ad esempio la sintesi di vitamine ed aminoacidi essenziali, esplicano numerose altre funzioni utili all'ospite.

A tutt'oggi risultano ancora in gran parte oscure sia le complesse interazioni esistenti tra le diverse popolazioni batteriche che le molteplici influenze esercitate dal microbiota intestinale sull'uomo. Studi e ricerche condotte in tutto il mondo hanno comunque evidenziato che la microflora batterica è in grado di proteggere contro germi patogeni, stimolare il sistema immunitario ed in generale indurre numerosi effetti benefici sulla salute.

Si ritiene che questa microflora commensale, la cui quantità di cellule è circa 20 volte superiore rispetto a quella dell'intero organismo umano, possa essere costituita da una grande varietà di specie diverse

(400-500), ma si pensa che, dal punto di vista numerico, il 99% sia rappresentato da 30-40 specie prevalenti.

Al momento le conoscenze acquisite riguardano essenzialmente la microflora presente nelle feci e quindi rappresentativa quasi esclusivamente della parte distale del grosso intestino, limitazione questa dovuta alle tecniche di cui si dispone che non permettono altri tipi di prelievi.

Negli ultimi anni sono state effettuate alcune ricerche sulle comunità batteriche presenti in campioni prelevati "in vivo", mediante biopsia, in varie parti dell'apparato digerente, soprattutto a livello di colon ascendente, trasverso e discendente. Le poche informazioni acquisite indicano che la microflora intestinale è distribuita in termini qualitativi e quantitativi in maniera molto diversificata nei vari tratti.

E' stato inoltre accertato che in uno stesso individuo la microflora adesa alla mucosa è molto diversa da quella che si trova nel lume, sottolineando come lo stato dell'arte acquisito fino ad ora sul microbiota intestinale, basato quasi esclusivamente sullo studio delle popolazioni batteriche presenti nelle feci, sia assolutamente parziale ed incompleto.

Esistono in effetti oggettive difficoltà di indagine che possono essere ricondotte essenzialmente a due fattori: la complessità microbica della popolazione batterica e la complicazione connessa all'esecuzione di prelievi "in vivo" dei vari tratti del piccolo e grosso intestino.

Le problematiche relative alla determinazione della composizione quali/quantitativa della microflora intestinale prelevata sono in gran parte state risolte nell'ultimo decennio. Infatti, se precedentemente si

poteva far affidamento esclusivamente su tecniche convenzionali di microbiologia in grado di evidenziare solo in parte, mediante l'uso di terreni colturali selettivi e differenziali, la biodiversità esistente nell'ambito dell'ecosistema intestinale, ora grazie all'impiego di tecniche di biologia molecolare (PCR, ARDRA, RAPD, Ribotyping, REA, PFGE, sonde DNA, ecc.) si possono rilevare, identificare e classificare tutti i batteri presenti, anche se minoritari, all'interno di un ecosistema complesso.

Di particolare utilità si sono rivelate le tecniche atte a determinare la sequenza nucleotidica dell'RNA ribosomale delle regioni 16S e 23S che, essendo costituite da geni a sequenza nucleotidica ipervariabile, presentano profili caratteristici per ogni specie microbica.

Da pochissimo tempo l'uso combinato della PCR (*Polymerase Chain Reaction*) con la DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) ovvero con la TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*), permette di determinare velocemente ed in maniera economica, dopo estrazione del DNA totale e successiva amplificazione dell'rRNA relativo al gene 16S, la composizione microbica di popolazioni batteriche miste e di generare un *fingerprinting* genetico dell'intera comunità.

Con questa strategia analitica è possibile quindi anche monitorare e valutare qualunque cambiamento si verifichi nell'ambito di una popolazione batterica variamente articolata in generi, specie e biotipi.

Pochi passi avanti sono viceversa stati compiuti nelle tecniche di prelievo di campioni tessutali "in vivo".

Ciò costituisce un grande limite per l'approfondimento delle conoscenze sulla microflora adesa alle pareti, che rappresenta la



Dr.ssa Tiziana SANTORO (537BM)

Tiziana

componente più importante dell'intera microflora proprio perché direttamente a contatto con l'epitelio di superficie dei villi intestinali e quindi maggiormente coinvolta nel mantenimento dell'integrità delle cellule di parete, nella regolazione dell'assorbimento di nutrienti ed acqua e nella modulazione del sistema immunitario.

Sussistono pertanto a tutt'oggi numerose lacune circa la composizione ed i ruoli delle diverse popolazioni batteriche e le interazioni esistenti tra microflora del lume e microflora adesa alle pareti e tra microflora adesa e cellule epiteliali.

L'urgenza di colmare questa insufficienza di informazioni è tanto maggiore se si considera che negli ultimi anni si è assistito ad un crescente interesse da parte dei consumatori per preparazioni commerciali contenenti cellule vive di microrganismi, definiti probiotici.

La quasi totalità dei ceppi utilizzati fino ad ora in questi prodotti, comprendenti specialità farmaceutiche, preparati dietetici ed alimenti arricchiti con probiotici, appartengono ai generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, isolati quasi esclusivamente da campioni fecali e quindi, come tali, rappresentativi solamente della microflora del lume del colon sigmideo e trasverso.

E' del tutto evidente che preparati probiotici formulati con tali ceppi, pur inducendo sul consumatore effetti benefici, in molti casi documentati anche da prove cliniche (miglioramento della motilità intestinale, diminuzione dei sintomi di intolleranza al lattosio, inibizione di batteri nocivi che provocano dissenteria o infezioni intestinali ecc.), non possono svolgere le funzioni proprie dell'intera microflora intestinale,

sia per la mancanza di una analoga complessità compositiva e sia per l'assenza di ceppi specifici della mucosa.

In effetti tali limiti sono stati evidenziati da tutte le prove cliniche fino ad ora eseguite, dove è stato dimostrato che già dopo 3 - 12 giorni dalla cessazione dell'assunzione di un qualunque ceppo probiotico, lo stesso non è più riscontrabile nelle feci, a dimostrazione del fatto che la colonizzazione è stata solo temporanea ed ha interessato esclusivamente il lume intestinale e non la parete.

Per prevenire e/o risolvere molti stati anomali e patologici del tratto gastrointestinale quali i disordini funzionali o FBD (Functional Bowel Disorders), le malattie infiammatorie croniche dell'intestino o IBD (Inflammatory Bowel Diseases), il morbo di Crohn, la colite ulcerosa e tante altre patologie gravi e debilitanti che coinvolgono l'intestino, è indispensabile studiare più a fondo le comunità dei diversi tratti dell'intestino e soprattutto la microflora adesa alle mucose e disporre di tutti i vari ceppi di batteri adesi nei vari tratti dell'intestino.

Disporre della conoscenza della distribuzione quali-quantativa di tali ceppi, oltre che essere importante da un punto di vista teorico, è altresì particolarmente utile per la messa a punto di terapie mirate.

Infatti, i batteri adesi nei vari distretti dell'intestino possiedono implicitamente la peculiarità di colonizzare tale porzione di intestino anche quando somministrati per via orale e di conseguenza la conoscenza specifica della distribuzione della microflora e delle variazioni individuali permetterebbe di

Per questi motivi gli inventori hanno cercato di trovare nuove

tecniche di prelievo che permettessero di recuperare ceppi adesi a specifici tratti dell'intestino o al muco allo scopo di analizzarli, riprodurli e utilizzarli per il trattamento dei vari disturbi della microflora intestinale.

Così, l'invenzione concerne secondo uno dei suoi aspetti una nuova tecnica di prelievo di campioni di mucosa mediante "spazzolamento", qui di seguito "brushing", multiplo di differenti segmenti della parete intestinale finalizzata al prelievo di ceppi di batteri adesi alla stessa.

Più in particolare, l'invenzione ha per oggetto un procedimento per il prelievo di batteri adesi alla parete intestinale di un soggetto che comprende effettuare detto prelievo per mezzo di una colonscopia che impiega opportuni strumenti dotati di spazzolini adatti al prelievo di ceppi batterici.

Secondo un aspetto vantaggioso della presente invenzione, il prelievo è effettuato in diversi segmenti dell'intestino a mezzo di singoli spazzolini.

Secondo un altro aspetto preferito il prelievo è effettuato su almeno una tra le pareti dell'ileo distale, del colon destro, del trasverso e del sigma, vantaggiosamente su tutte e quattro le pareti sopra citate, cambiando 4 spazzolini per ogni soggetto, vantaggiosamente lavando con soluzione fisiologica il canale da biopsia prima dell'introduzione di ogni spazzolino.

Per effettuare la colonscopia utile all'invenzione, si impiegano i materiali e le attrezzature convenzionalmente impiegate per queste procedure, con l'accorgimento di applicare gli spazzolini che permettono il prelievo dei batteri adesi.

Detti spazzolini possono essere come quelli di norma impiegati in citologia o nelle ricerche microbiologiche di patogeni, ad esempio quelli forniti dalle Boston Scientific, Wilson Cook ed Innovamedica.

Una volta prelevati, i ceppi vengono fatti crescere in coltura e analizzati mediante le tecniche note all'esperto del ramo. A titolo di esempio i campioni possono essere analizzati mediante PCR-DGGE.

Così, secondo un altro dei suoi aspetti, l'invenzione ha per oggetto un procedimento per l'isolamento di ceppi batterici adesi alla parete intestinale di un soggetto che comprende effettuare detto prelievo per mezzo di una colonoscopia che impiega opportuni strumenti dotati di spazzolini adatti al prelievo di ceppi batterici, mettere in coltura e identificare tali ceppi prelevati.

I ceppi prelevati e identificati possono quindi essere fatti crescere allo scopo di preparare dei medicamenti o dei prodotti alimentari che li comprendano, al fine di trattare le patologie derivanti dalla alterazione della microflora intestinale.

Una volta identificati, i ceppi di batteri di tipo probiotico possono essere utilizzati in terapia e nell'industria alimentare e dietetica.

Secondo un altro dei suoi aspetti, l'invenzione concerne anche l'uso di ceppi batterici prelevati mediante il procedimento dell'invenzione per la preparazione di medicamenti destinati a trattare e/o a prevenire le alterazioni della microflora intestinale.

Allo scopo di essere somministrati come medicamenti i ceppi prelevati secondo l'invenzione vengono preferibilmente formulati in composizioni farmaceutiche secondo le tecniche note.



Dr.ssa Tiziana SANTORO (537BM)

Tiziana

Secondo un altro dei suoi aspetti, l'invenzione concerne anche delle composizioni farmaceutiche comprendenti ceppi batterici prelevati mediante il procedimento dell'invenzione destinate a trattare e/o a prevenire le alterazioni della microflora intestinale.

Le composizioni dell'invenzione comprendono i ceppi preferibilmente in forma liofilizzata e sono vantaggiosamente formulate in forma di unità di dosaggio, ad esempio bustine, fiale, ecc.

Le prime analisi effettuate mediante il procedimento dell'invenzione ha sorprendentemente evidenziato, contrariamente a quanto si ritiene comunemente, la presenza di numerosi bifidobatteri anche a livello di mucosa del tenue distale.

Sulla base delle informazioni già acquisite e su quelle ancora acquisibili mediante la messa in opera del procedimento dell'invenzione, è ad esempio possibile concepire la formulazione di specifici prodotti probiotici a base di questi bifidobatteri specifici, capaci di aderire alle cellule epiteliali dell'intestino tenue, per combattere, ad esempio, il morbo di Crohn, che come è noto, colpisce prevalentemente il piccolo intestino.

Alternativamente i ceppi ottenibili mediante il procedimento dell'invenzione possono essere utilizzati nell'industria alimentare per la preparazione di alimenti probiotici; a questo scopo i ceppi possono essere inclusi di varie preparazioni alimentari quali latticini, yogurt, bibite, ecc.

Gli alimenti probiotici comprendenti i ceppi ottenuti secondo il procedimento dell'invenzione costituiscono un ulteriore oggetto

dell'invenzione.

Nella parte sperimentale che segue sono riportate alcune tecniche utilizzabili e i il protocollo utilizzato per la verifica dell'attuabilità del procedimento dell'invenzione. Gli esempi sono forniti a scopo illustrativo e in nessun modo limitativo.

Sezione sperimentale

Esempio 1.

Procedimento di prelievo e coltura di ceppi adesi

È stata effettuata colonoscopia effettuata per motivi di screening a 10 individui sani dall'età compresa tra 36 e 65 anni, 4 maschi e 6 femmine. Per ogni soggetto sono stati effettuati n. 4 prelievi, q livello dell'ileo distale, colon destro, trasverso e sigma, cambiando 4 spazzolini per ogni paziente e lavando con soluzione fisiologica il canale da biopsia prima dell'introduzione di ogni spazzolino. La punta di ogni spazzolino è stata tagliata e posta in capsula sterile di Petri, immediatamente portata in condizioni di anaerobiosi ed alla temperatura di + 4°C. I vari prelievi sono stati inviati al laboratorio di Microbiologia entro 3 ore.

Esempio 2.

Identificazione dei ceppi

I campioni sono stati analizzati mediante PCR-DGGE, secondo la metodica descritta in letteratura (riferimenti bibliografici):

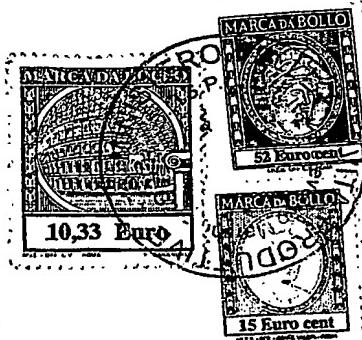
1. Temmerman R, Scheirlinck I, Huys G, Swings J. "Culture-independent analysis of probiotic products by denaturating gradient gel electrophoresis." Appl Environ Microbiol 2003 Jan; 69(1):220-6

2. Burton JP, Cadieux PA, Reid G "Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic instillation" *Appl Environ Microbiol* 2003 Jan; 69 (1): 97-101
3. Burton JP, Reid G "Evaluation of the bacterial vaginal flora of 20 postmenopausal women by direct (Nugent score) and molecular (polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis) techniques" *J Infect Dis.* 2002 Dec. 15; 186 (12):1770-80 Epub 2002 Nov. 22.
4. McCartney AL. "Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora" *Br J Nutr.* 2002 Sep; 88 Suppl 1:S29-37 Review.
5. Zoetendal EG, von Wright A, Vilpponen-Salmela T, Ben-Amor K, Akkermans AD, de Vos WM. "Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces." *Appl Environ Microbiol.* 2002 July; 68(7):3401-7
6. Heilig HG, Zoetendal EG, Vaughan EE, Marteau P, Akkermans AD, de Vos WM. "Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. And other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16s ribosomal DNA." *Appl Environ Microbiol.* 2002 Jan; 68(1):114-23
7. Walter J, Hertel C, Tannock GW, Lis CM, Munro K, Hammes WP."Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group- specific PCR primers and denaturino gradient gel electrophoresis." *Appl Environ*


Dr.ssa Tiziana SANTORO (537BM)

Microbiol. 2001 Jun; 67(6):2578-85.

I risultati della analisi hanno mostrato la presenza di numerosi bifidobatteri anche a livello di mucosa del tenue distale.



Tiziana Santoro
Dr.ssa Tiziana SANTORO (S37BM)

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento per il prelievo di batteri adesi alla parete intestinale di un soggetto caratterizzato dal fatto di effettuare detto prelievo per mezzo di una colonoscopia mediante spazzolini adatti al prelievo di cellule.
2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detti spazzolini sono collegati a strumenti convenzionali per colonoscopia.
3. Procedimento secondo le rivendicazioni 1 o 2, caratterizzato dal fatto di effettuare detto prelievo in diversi segmenti dell'intestino a mezzo di singoli spazzolini.
4. Procedimento secondo la rivendicazione 3, caratterizzato dal fatto di effettuare detto prelievo almeno una tra le pareti dell'ileo distale, del colon destro, del trasverso e del sigma.
5. Procedimento secondo la rivendicazione 4, caratterizzato dal fatto di effettuare detto prelievo dalle pareti dell'ileo distale, del colon destro, del trasverso e del sigma.
6. Procedimento secondo le rivendicazioni precedenti, caratterizzato dal fatto che i ceppi prelevati vengono fatti crescere in coltura e analizzati.
7. Procedimento per l'isolamento di ceppi batterici che comprende il prelievo di detti ceppi secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti.
8. Uso di ceppi batterici probiotici ottenuti mediante il procedimento delle rivendicazioni da 1 a 7, per la

Santoro
Dr.ssa Tiziana SANTORO (537BM)

preparazione di medicamenti destinati a trattare e/o a prevenire le alterazioni della microflora intestinale.

9. Composizioni farmaceutiche comprendenti ceppi batterici probiotici ottenuti mediante il procedimento delle rivendicazioni da 1 a 7, destinate a trattare e/o a prevenire le alterazioni della microflora intestinale.
10. Alimento probiotico comprendente ceppi batterici probiotici ottenuti mediante il procedimento delle rivendicazioni da 1 a 7.

Santoro
Dr. T. Santoro (No. Iscr. 537)

